

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

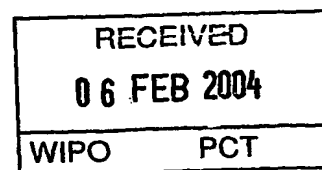
11.12.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年12月12日

出願番号
Application Number: 特願2002-361415
[ST. 10/C]: [JP 2002-361415]



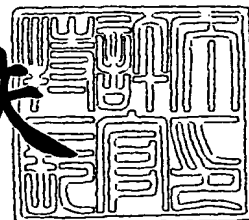
出願人
Applicant(s): 武田薬品工業株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 1月22日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
 【整理番号】 B02398
 【提出日】 平成14年12月12日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 A61K 38/00
 C07K 14/705
 C12N 15/12
 G01N 33/53

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市春日 1 丁目 7 番地 9 武田春日ハイッ 1
 4 0 2 号

【氏名】 日沼 州司

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市松代 3 丁目 1 2 番地の 1 武田松代レジ
 デンス 2 0 8 号室

【氏名】 丸山 穰

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市春日 2 丁目 3 3 番地 1 6

【氏名】 藤井 亮

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100114041

【弁理士】

【氏名又は名称】 高橋 秀一

【選任した代理人】

【識別番号】 100106323

【弁理士】

【氏名又は名称】 関口 陽

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9909276

【包括委任状番号】 0203423

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書**【発明の名称】 EDG受容体の新規用途****【特許請求の範囲】**

【請求項1】 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-2受容体、配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-3受容体、配列番号：9で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-5受容体、その部分ペプチドまたはその塩を含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤。

【請求項2】 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-2受容体、配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-3受容体、配列番号：9で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-5受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤。

【請求項3】 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-2受容体、配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-3受容体、配列番号：9で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-5受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の診断剤。

【請求項4】 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-2受容体、配列番号：5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-3受容体、配列番号：9で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-5受容体、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を

含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤。

【請求項 5】 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、配列番号：5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、配列番号：9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の診断剤。

【請求項 6】 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、配列番号：5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、配列番号：9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチドを含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤。

【請求項 7】 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、配列番号：5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、配列番号：9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチドを含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の診断剤。

【請求項 8】 (i) リゾフォスファチジン酸またはその塩および (ii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、その部分ペプチドまたはその塩を用いて、リゾフォスファチジン酸またはその塩と該 EDG-2 受容体またはその塩との結合性を変化さ

せる化合物またはその塩を選択することを特徴とする糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 9】 (i) リゾフォスファチジン酸またはその塩および (ii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、その部分ペプチドまたはその塩を含有する EDG-2 受容体、その部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療薬のスクリーニング用キット。

【請求項 10】 (i) スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩および (ii) 配列番号：5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、その部分ペプチドまたはその塩を用いて、スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩と該 EDG-3 受容体またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を選択することを特徴とする糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 11】 (i) スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩および (ii) 配列番号：5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、その部分ペプチドまたはその塩を含有する EDG-3 受容体、その部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療薬のスクリーニング用キット。

【請求項 12】 (i) スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩および (ii) 配列番号：9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体、その部分ペプチドまたはその塩を用いて、スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩と該 EDG-5 受容体またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を選択することを特徴とする糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 13】 (i) スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩および (ii) 配列番号: 9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体、その部分ペプチドまたはその塩を含有する EDG-5 受容体、その部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療薬のスクリーニング用キット。

【請求項 14】 (i) リゾフォスファチジン酸またはその塩と (ii) 配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤。

【請求項 15】 (i) スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩と (ii) 配列番号: 5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤。

【請求項 16】 (i) スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩と (ii) 配列番号: 9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤。

【請求項 17】 配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、配列番号: 5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、配列番号: 9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを用いることを特徴とする該 EDG-2 受容体、EDG-3 受容体または EDG-5 受容体の発現量を変化させ、糖尿病性腎症疾、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫を予防・

治療する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 18】 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、配列番号：5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、配列番号：9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有することを特徴とする該 EDG-2 受容体、EDG-3 受容体または EDG-5 受容体の発現量を変化させ、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫を予防・治療する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 19】 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、配列番号：5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体または配列番号：9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤。

【請求項 20】 哺乳動物に対して、① (i) リゾフォスファチジン酸またはその塩と (ii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、② (i) スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩と (ii) 配列番号：5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、または③ (i) スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩と (ii) 配列番号：9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療方法。

【請求項 21】糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤を製造するための、① (i) リゾフォスファチジン酸またはその塩と (ii) 配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、② (i) スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩と (ii) 配列番号: 5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、または③ (i) スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩と (ii) 配列番号: 9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、EDG-2 受容体、EDG-3 受容体または EDG-5 受容体、およびそれらをコードするポリヌクレオチドの用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

EDG-2 受容体 (非特許文献 1)、EDG-3 受容体 (非特許文献 2)、EDG-5 受容体 (非特許文献 3) が報告されており、これらレセプターが血管組織に発現していることが記載されている。

リゾフォスファチジン酸が腎臓メサンギウム細胞上の受容体に結合し、PDGF と共に MAPK を活性化し、メサンギウム細胞の増殖に関与していること、EDG-2 受容体および EDG-4 受容体がリゾフォスファチジン酸に対する受容体であること、リゾフォスファチジン酸が IgA 腎症に関与していることなどが知られている (非特許文献 4)。

スフィンゴシン-1-リン酸が腎臓メサンギウム細胞に発現している EDG-3 受容体または EDG-5 受容体に結合して、メサンギウム細胞を増殖させるこ

と、IgA腎症の腎臓でEDG-5受容体が増加していることが知られている（非特許文献5）。

しかしながら、これら受容体が糖尿病性腎症に関与していることは知られていなかった。

【0003】

【非特許文献1】

Biochem Biophys Res Commun 1997 Feb
24;231(3):619-22

【0004】

【非特許文献2】

Cell 1999 Oct 29;99(3):301-12

【0005】

【非特許文献3】

J Biol Chem 1999 Dec 10;274(50):3534
3-50

【0006】

【非特許文献4】

Clinical Science (1999) 96, 431-436

【0007】

【非特許文献5】

The pharmacogenomics Journal (2001) 1,
211-217

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、EDG-2受容体、EDG-3受容体またはEDG-5受容体の機能を解明し、これらの受容体の新たな用途を提供することを課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために、鋭意研究を重ねた結果、ヒトED

G-2 受容体、ヒト EDG-3 受容体またはヒト EDG-5 受容体がヒト正常メサンギウム細胞で高発現していること、さらに糖尿病性腎症モデルラットの腎臓において EDG-2 受容体、EDG-3 受容体または EDG-5 受容体が高発現していることを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、配列番号：5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、配列番号：9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体、その部分ペプチドまたはその塩を含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤、

(2) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、配列番号：5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、配列番号：9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤、

(3) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、配列番号：5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、配列番号：9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の診断剤、

(4) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、配列番号：5 で表されるアミノ酸配列と

同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、配列番号: 9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤、

(5) 配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、配列番号: 5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、配列番号: 9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体、その部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の診断剤、

(6) 配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、配列番号: 5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、配列番号: 9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチドを含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤、

(7) 配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、配列番号: 5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、配列番号: 9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチドを含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の診断剤、

(8) (i) リゾフォスファチジン酸またはその塩および (ii) 配列番号: 1 で

表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、その部分ペプチドまたはその塩を用いて、リゾフォスファチジン酸またはその塩と該 EDG-2 受容体またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を選択することを特徴とする糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療薬のスクリーニング方法、

(9) (i) リゾフォスファチジン酸またはその塩および (ii) 配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、その部分ペプチドまたはその塩を含有する EDG-2 受容体、その部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療薬のスクリーニング用キット、

(10) (i) スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩および (ii) 配列番号: 5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、その部分ペプチドまたはその塩を用いて、スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩と該 EDG-3 受容体またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を選択することを特徴とする糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療薬のスクリーニング方法、

(11) (i) スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩および (ii) 配列番号: 5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、その部分ペプチドまたはその塩を含有する EDG-3 受容体、その部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療薬のスクリーニング用キット、

(12) (i) スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩および (ii) 配列番号: 9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体、その部分ペプチドまたはその塩を用いて、スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩と該 EDG-5 受容体またはその塩との結合性を変

化させる化合物またはその塩を選択することを特徴とする糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療薬のスクリーニング方法、

(13) (i) スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩および (ii) 配列番号: 9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体、その部分ペプチドまたはその塩を含有する EDG-5 受容体、その部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療薬のスクリーニング用キット、

(14) (i) リゾフォスファチジン酸またはその塩と (ii) 配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤、

(15) (i) スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩と (ii) 配列番号: 5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤、

(16) (i) スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩と (ii) 配列番号: 9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤、

(17) 配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、配列番号: 5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、配列番号: 9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチ

ドを含有するポリヌクレオチドを用いることを特徴とする該EDG-2受容体、EDG-3受容体またはEDG-5受容体の発現量を変化させ、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫を予防・治療する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(18) 配列番号: 1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-2受容体、配列番号: 5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-3受容体、配列番号: 9で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-5受容体またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有することを特徴とする該EDG-2受容体、EDG-3受容体またはEDG-5受容体の発現量を変化させ、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫を予防・治療する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(19) 配列番号: 1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-2受容体、配列番号: 5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-3受容体または配列番号: 9で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-5受容体の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤、

(20) 哺乳動物に対して、①(i) リゾフォスファチジン酸またはその塩と(ii) 配列番号: 1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-2受容体、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、②(i) スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩と(ii) 配列番号: 5で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-3受容体、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、または③(i) スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩と(ii) 配列番号: 9で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-5受容体、その部分ペプ

チドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療方法、および

(21) 糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤を製造するための、① (i) リゾフォスファチジン酸またはその塩と (ii) 配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-2 受容体、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、② (i) スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩と (ii) 配列番号: 5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-3 受容体、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、または③ (i) スフィンゴシン-1-リン酸またはその塩と (ii) 配列番号: 9 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する EDG-5 受容体、その部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の使用などを提供する。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明で用いられる EDG-2 受容体は、配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質である。

本発明で用いられる EDG-3 受容体は、配列番号: 5 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質である。

本発明で用いられる EDG-5 受容体は、配列番号: 9 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質である。

以下、EDG-2 受容体、EDG-3 受容体および EDG-5 受容体を単に EDG 受容体と略記する場合がある。

EDG 受容体は、例えば、ヒトやその他の哺乳動物（例えば、モルモット、ラ

ット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)のあらゆる細胞〔例えば、網膜細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓 β 細胞、骨髓細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球、白血球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞(例、乳癌細胞株(GI-101)、結腸癌細胞株(CX-1、GI-112)、肺癌細胞株(LX-1、GI-117)、卵巣癌細胞株(GI-102)、前立腺癌細胞株など)など〕、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳染、黒質)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞(例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など)に由来するタンパク質であってもよく、また合成タンパク質であってもよい。EDG受容体は特に、腎臓またはメサングウム細胞で特に高発現している。

【0011】

本明細書において、「実質的に同一のアミノ酸配列」とは、比較するアミノ酸配列に対して、例えば、約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、なかでも好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列をいう。

配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有

するEDG-2受容体としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列からなるEDG-2受容体と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：5で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-3受容体としては、例えば、配列番号：5で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：5で表わされるアミノ酸配列からなるEDG-3受容体と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：9で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するEDG-5受容体としては、例えば、配列番号：9で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：9で表わされるアミノ酸配列からなるEDG-5受容体と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

リガンド結合活性、レセプター結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後に記載するスクリーニング方法に従って測定することができる。

【0012】

EDG受容体としては、（1）配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、（2）配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9

、配列番号：11で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、（3）配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または（4）それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども用いられる。

【0013】

本明細書におけるEDG受容体は、ペプチド標記の慣例に従って、左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。EDG受容体は、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピルもしくは n -ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

EDG受容体がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明でいうEDG受容体に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、EDG受容体には、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、イ

ンドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

【0014】

EDG-2受容体の具体例としては、例えば、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列からなるヒトEDG-2受容体、配列番号:3で表わされるアミノ酸配列からなるラットEDG-2受容体などが挙げられる。

EDG-3受容体の具体例としては、例えば、配列番号:5で表わされるアミノ酸配列からなるヒトEDG-3受容体、配列番号:7で表わされるアミノ酸配列からなるラットEDG-3受容体(断片)などが挙げられる。

EDG-5受容体の具体例としては、例えば、配列番号:9で表わされるアミノ酸配列からなるヒトEDG-5受容体、配列番号:11で表わされるアミノ酸配列からなるラットEDG-5受容体などが挙げられる。

ヒトEDG-2受容体は(Genbank accession 番号 U80811、Biochem Biophys Res Commun 1997 Feb 24;231(3):619-22)に記載されている公知のタンパク質である。

ラットEDG-2受容体は(Genbank # NM 053936)に記載されている公知のタンパク質である。

ヒトEDG-3受容体は(Cell 1999 Oct 29;99(3):301-12)に記載されている公知のタンパク質である。

ラットEDG-3受容体(断片)は(Genbank # AF184914)に記載されている公知のタンパク質である。

ヒトEDG-5受容体は(J Biol Chem 1999 Dec 10;274(50):35343-50)に記載されている公知のタンパク質である。

ラットEDG-5受容体は(Genbank # NM 017192)に記載されている公知のタンパク質である。

EDG受容体またはその塩は、上記したヒトや哺乳動物の細胞または組織から公知のレセプタータンパク質の精製方法によって製造することもできるし、後に記載するEDG受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後に記載するタンパク質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

【0015】

EDG受容体の部分ペプチド（以下、単に「部分ペプチド」と略記する場合がある）としては、上記したEDG受容体の部分アミノ酸配列を有するペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、EDG受容体の分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、EDG受容体と実質的に同質のレセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列からなるEDG-2受容体、配列番号：5で表わされるアミノ酸配列からなるEDG-3受容体または配列番号：9で表わされるアミノ酸配列からなるEDG-5受容体の部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

部分ペプチドのアミノ酸の数は、上記したEDG受容体の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

ここで、「実質的に同質のレセプター結合活性」とは、上記と同意義を示す。「実質的に同質のレセプター結合活性」の測定は上記と同様に行なうことができる。

【0016】

また、部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

さらに、部分ペプチドには、上記したEDG受容体と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

EDG受容体またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

EDG受容体の部分ペプチドまたはその塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいはEDG受容体を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、EDG受容体を構成し得る部分ペプチドも

しくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下のa) ~e) に記載された方法が挙げられる。

a) M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

b) SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

c) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

d) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

e) 矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0017】

EDG受容体をコードするポリヌクレオチドとしては、上記したEDG受容体をコードする塩基配列(DNAまたはRNA、好ましくはDNA)を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、EDG受容体をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖(すなわち、コード鎖)であっても、アンチセンス鎖(すなわち、非コード鎖)であってもよい。

EDG受容体をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の公知の方法またはそれに準じた方法により、EDG受容体のmRNAを定量することができる。

EDG受容体をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞または組織由来のcDNA、上記した細胞または組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞または組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

具体的には、EDG-2受容体をコードするDNAとしては、例えば、配列番号: 2または配列番号: 4で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号: 2または配列番号: 4で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、配列番号: 1または配列番号: 3で表わされるアミノ酸配列からなるEDG-2受容体と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセプタータンパク質をコードするDNAが挙げられる。

EDG-3受容体をコードするDNAとしては、例えば、配列番号: 6または配列番号: 8で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号: 6または配列番号: 8で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、配列番号: 5または配列番号: 7で表わされるアミノ酸配列からなるEDG-3受容体と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセプタータンパク質をコードするDNAが挙げられる。

EDG-5受容体をコードするDNAとしては、例えば、配列番号: 10または配列番号: 12で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号: 10または配列番号: 12で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、配列番号: 9または配列番号: 11で表わされるアミノ酸配列からなるEDG-5受容体と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセプタータンパク質をコードするDNAが挙げられる。

配列番号: 2、配列番号: 4、配列番号: 6、配列番号: 8、配列番号: 10
または配列番号: 12 で表わされる塩基配列を有する DNA とハイストリンジェ
ントな条件下でハイブリダイズする DNA としては、例えば、配列番号: 4、配
列番号: 6、配列番号: 8、配列番号: 10 または配列番号: 12 で表わされる
塩基配列と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以
上、さらに好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列を含有する DNA
などが用いられる。

【0018】

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、
モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al.,
Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうこと
ができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載
の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな
条件に従って行なうことができる。

「該ハイストリンジェントな条件」とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19 ~
40 mM、好ましくは約 19 ~ 20 mM で、温度が約 50 ~ 70 °C、好ましくは
約 60 ~ 65 °C の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 19 mM で温度が約 6
5 °C の場合が最も好ましい。

配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列からなるヒト EDG-2 受容体をコード
する DNA としては、配列番号: 2 で表わされる塩基配列からなる DNA など
が用いられる。

配列番号: 3 で表わされるアミノ酸配列からなるラット EDG-2 受容体をコ
ードする DNA としては、配列番号: 4 で表わされる塩基配列からなる DNA な
どが用いられる。

配列番号: 5 で表わされるアミノ酸配列からなるヒト EDG-3 受容体をコード
する DNA としては、配列番号: 6 で表わされる塩基配列からなる DNA など
が用いられる。

配列番号: 7 で表わされるアミノ酸配列からなるラット EDG-3 受容体 (断
片) をコードする DNA としては、配列番号: 8 で表わされる塩基配列からなる

DNAなどが用いられる。

配列番号：9で表わされるアミノ酸配列からなるヒトEDG-5受容体をコードするDNAとしては、配列番号：10で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。

配列番号：11で表わされるアミノ酸配列からなるラットEDG-5受容体をコードするDNAとしては、配列番号：12で表わされる塩基配列からなるDNAなどが用いられる。

【0019】

本発明の「EDG受容体をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチド」とは、下記のEDG受容体の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけではなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、EDG受容体遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたEDG受容体をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド（核酸）は、EDG受容体遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいはEDG受容体関連RNAとの相互作用を介してEDG受容体遺伝子の発現を調節・制御することができる。EDG受容体関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、およびEDG受容体関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外でEDG受容体遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（タンパク質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（タンパク質）のアミノ酸を通常指している。レセプタータンパク質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、O

R F 翻訳終止コドン、3' 端非翻訳領域、3' 端パリンドローム領域、および 3' 端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、レセプタータンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

EDG 受容体またはその部分ペプチド（以下、包括的に EDG 受容体と略記する場合がある）を完全にコードする DNA のクローニングの手段としては、EDG 受容体の部分塩基配列を有する合成 DNA プライマーを用いて PCR 法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだ DNA を EDG 受容体の一部あるいは全領域をコードする DNA 断片もしくは合成 DNA を用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

【0020】

(アンチセンス・ポリヌクレオチド)

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基の N-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質、核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーは DNA や RNA 中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、二本鎖 DNA、一本鎖 DNA、二本鎖 RNA、一本鎖 RNA、さらに DNA:RNA ハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1 個

以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーL-リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレート化合物（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

【0021】

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al.,

Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3' 端あるいは5' 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3' 端あるいは5' 端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはレセプタータンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸は公知の各種の方法で細胞に適用できる。

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチドは、生体内におけるEDG受容体または本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）の機能を抑制することができるので、例えば、EDG受容体の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤として用いることができる。さらに、本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできるので、EDG受容体の機能不全に関連する疾患の診断に用いることができる。

【0022】

(部分ペプチドをコードするDNA)

EDG受容体の部分ペプチドをコードするDNAとしては、上記したEDG受容体の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞または組織由来のcDNA、上記した細胞または組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞または組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

具体的には、EDG-2受容体の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、

(1) 配列番号: 2 または配列番号: 4 で表わされる塩基配列を含有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、

(2) 配列番号: 2 または配列番号: 4 で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、配列番号: 1 または配列番号: 3 で表わされるアミノ酸配列からなるEDG-2受容体と実質的に同質の活性 (例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など) を有するレセプタータンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

EDG-3受容体の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、

(1) 配列番号: 6 または配列番号: 8 で表わされる塩基配列を含有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、

(2) 配列番号: 6 または配列番号: 8 で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、配列番号: 5 または配列番号: 7 で表わされるアミノ酸配列からなるEDG-3受容体と実質的に同質の活性 (例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など) を有するレセプタータンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAな

どが用いられる。

EDG-5受容体の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、

(1) 配列番号: 10 または配列番号: 12 で表わされる塩基配列を含有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、

(2) 配列番号: 10 または配列番号: 12 で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、配列番号: 9 または配列番号: 11 で表わされるアミノ酸配列からなるEDG-5受容体と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセプタータンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号: 2、配列番号: 4、配列番号: 6、配列番号: 8、配列番号: 10 または配列番号: 12 で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号: 2、配列番号: 4、配列番号: 6、配列番号: 8、配列番号: 10 または配列番号: 12 で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

【0023】

EDG受容体もしくはその部分ペプチドまたはその塩(以下、EDG受容体と略記する場合がある)に対する抗体は、EDG受容体、あるいはEDG受容体を含有する細胞を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

EDG受容体に対する抗体は、EDG受容体を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

【0024】

[モノクローナル抗体の作製]

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

EDG受容体は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高める

ため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化レセプタータンパク質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【0025】

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、レセプタータンパク質等の抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免

疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したレセプタータンパク質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0026】

（b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

【0027】

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（EDG受容体等の抗原）とキャリアタンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物からEDG受容体等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン 1 に対し、約 0.1 ~ 20、好ましくは約 1 ~ 5 の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約 2 ~ 6 週毎に 1 回ずつ、計約 3 ~ 10 回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0028】

[レセプタータンパク質、DNA などの用途]

EDG 受容体、EDG 受容体をコードする DNA（以下、本発明の DNA と略記する場合がある）、EDG 受容体に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、本発明の DNA に対するアンチセンス DNA（以下、本発明のアンチセンス DNA と略記する場合がある）などは、以下の用途を有している。

【0029】

(1) EDG 受容体の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤

EDG 受容体はメサングウム細胞や糖尿病性腎症モデルラットで高発現してい

ることから、a) EDG受容体、またはb) EDG受容体をコードするDNAを、EDG受容体の機能不全に関連する疾患、特に糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内においてEDG受容体が減少しているために、EDG受容体またはそれに対するリガンドの生理作用が期待できない(EDG受容体の欠乏症)患者がいる場合に、a) EDG受容体を該患者に投与し、EDG受容体の量を補充したり、b) (イ) EDG受容体をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ロ) 対象となる細胞にEDG受容体をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるEDG受容体の量を増加させ、EDG受容体またはリガンドの作用を十分に発揮させることができる。

すなわち、EDG受容体または本発明のDNAは、安全で低毒性な該EDG受容体の機能不全に関連する疾患、特に糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤として有用である。

EDG受容体を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、本発明のDNAを上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、a) EDG受容体、またはb) 本発明のDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、a) EDG受容体もしくはIL20、またはb) 本発明のDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般

に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0030】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80 TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

EDG受容体の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、糖尿病性腎症患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、糖尿病性腎症患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、糖尿病性腎症患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、糖尿病性腎症患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0031】

(2) 本発明のDNAを用いる診断剤及び診断方法

本発明のDNAまたはアンチセンスDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）におけるEDG受容体またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

例えば、EDG受容体をコードするDNAは、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の診断剤として使用することができる。

【0032】

(3) 本発明のアンチセンスDNAを含有してなる医薬

本発明のアンチセンスDNAは、EDG受容体の過剰発現などに起因する疾患（例えば、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫）などの疾患の予防・治療薬として用いることができる。

例えば、該アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

本発明のDNAまたはアンチセンスDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミクス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），第86巻，2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションによりEDG受容体の発現低下または発現過多が検出された場合は、例えば、EDG受容体の機能不全または過剰発現に起因する疾患、特に糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫等に罹患している可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

【0033】

(4) EDG受容体の発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明のDNAは、プローブとして用いることにより、EDG受容体の発現量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、例えば、(i) 非ヒト哺乳動物の(1) 血液、(2) 特定の臓器、(3) 臓器から単離した組織もしくは細胞、または(ii) 形質転換体等に含まれるEDG受容体のmRNA量を測定することによる、EDG受容体の発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

【0034】

EDG受容体のmRNA量の測定は具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗癌剤など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肺、大腸、前立腺など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。

得られた細胞に含まれる本発明のタンパク質のmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えば、TaqMan PCRなどの手法を用いることにより定量することができ、公知の手段によりノーザンブロットを行うことにより解析することもできる。

(ii) EDG受容体を発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、該形質転換体に含まれるEDG受容体のmRNAを同様にして定量、解析することができる。

EDG受容体の発現量を変化させる化合物のスクリーニングは、

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与

後一定時間経過後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、細胞に含まれるEDG受容体のmRNA量を定量、解析することにより行なうことができ、

(ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後～7日後、好ましくは1日後～3日後、より好ましくは2日後～3日後）、該形質転換体に含まれるEDG受容体のmRNA量を定量、解析することにより行なうことができる。

【0035】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、EDG受容体の発現量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ) EDG受容体の発現量を増加させることにより、EDG受容体を介する細胞刺激活性を増強させる化合物、(ロ) EDG受容体の発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

細胞刺激活性としては、例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、細胞増殖、一酸化炭素産生、遊走活性、低分子量Gタンパク質RhoやRacの活性化、ホスファチジルイノシトール(PI)3キナーゼ活性、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性、好ましくはこれらを促進する活性などが挙げられる。

該化合物としては、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、EDG受容体の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、EDG受容体の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

上記スクリーニング方法で得られるEDG受容体の発現量を変化させる化合物は、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮

腫などの予防・治療剤として用いることができる。

【0036】

(5) EDG受容体の発現量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防・治療剤

EDG受容体の発現量を変化させる化合物は、EDG受容体の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤として用いることができる。

該化合物を前記したEDG受容体の機能不全に関連する疾患、例えば糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫の予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

【0037】

(6) EDG受容体とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング方法及びスクリーニングキット

EDG受容体等を用いるか、または組換え型レセプタータンパク質等の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドとEDG受容体等との結合性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

EDG-2受容体に対するリガンドとしては、EDG-2受容体に結合する化合物であれば特に限定されないが、例えば、リゾフォスファチジン酸 (lysophosphatidic acid (LPA)) またはその塩などが用いられる。

EDG-3受容体に対するリガンドとしては、EDG-3受容体に結合する化合物であれば特に限定されないが、例えば、スフィンゴシン-1-リン酸 (sphingosine-1-phosphate (S1P)) またはその塩などが用いられる。

EDG-5受容体に対するリガンドとしては、EDG-5受容体に結合する化合物であれば特に限定されないが、例えば、スフィンゴシン-1-リン酸 (sphingosine-1-phosphate (S1P)) またはその塩などが用いられる。

さらに、リガンドとしては、各EDG受容体とそれに対するリガンドの結合性を変化させる化合物（例えば、低分子合成アゴニストなど）またはその塩を用いることもできる。この各EDG受容体とそれに対するリガンドとの結合性を変化

させる化合物またはその塩は、例えば、リガンドとしてリゾフォスファチジン酸またはその塩あるいはスフィンゴシン-1-リン酸またはその塩を用いて、後述する本発明のスクリーニング方法を実施することによって得ることができる。

以下、それぞれの受容体に対するリガンドを単にリガンドと略記する。

【0038】

リガンドとEDG受容体との結合性を変化させる化合物には、(イ) レセプターを介して細胞刺激活性を有する化合物（いわゆる、EDG受容体に対するアゴニスト）、(ロ) 該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、EDG受容体に対するアンタゴニスト）、(ハ) リガンドとEDG受容体との結合力を増強する化合物、あるいは(ニ) リガンドとEDG受容体との結合力を減少させる化合物などが含まれる。

すなわち、本発明は、(i) EDG受容体もしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、EDG受容体等）と、リガンドとを接触させた場合と(ii) EDG受容体もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドとEDG受容体もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、(i) と(ii) の場合における、例えば、該レセプタータンパク質等に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

細胞刺激活性としては、例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、細胞増殖、一酸化炭素産生、遊走活性、低分子量Gタンパク質RhoやRacの活性化、ホスファチジルイノシトール(PI)3キナーゼ活性、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性、特にこれらの活性を促進する活性が挙げられる。

【0039】

より具体的には、本発明は、

(i) 標識したリガンドを、EDG受容体等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物をEDG受容体等に接触させた場合における、標識したリガンドのEDG受容体等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドとEDG受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(ii) 標識したリガンドを、EDG受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物をEDG受容体を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドとEDG受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(iii) 標識したリガンドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したEDG受容体に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したEDG受容体に接触させた場合における、標識したリガンドのEDG受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドとEDG受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(iv) EDG受容体を活性化する化合物（例えば、リガンドなど）をEDG受容体を含有する細胞に接触させた場合と、EDG受容体を活性化する化合物および試験化合物をEDG受容体を含有する細胞に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドとEDG受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

(v) EDG受容体を活性化する化合物（例えば、リガンドなど）を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したEDG受容体に接触させた場合と、EDG受容体を活性化する化合物および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したEDG受容体に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性

を測定し、比較することを特徴とするリガンドとEDG受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0040】

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いるEDG受容体としては、上記したEDG受容体を含有するものであれば何れのものであってもよいが、EDG受容体を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来のレセプタータンパク質等などが適している。

EDG受容体を製造するには、上記の方法が用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とするタンパク質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。EDG受容体をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行なうことができる。

なお、本発明のスクリーニング方法において、EDG受容体を含有するものとしては、公知の方法に従って精製したEDG受容体であってもよいし、EDG受容体を含有する細胞を用いてもよく、またEDG受容体を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

【0041】

本発明のスクリーニング方法において、EDG受容体を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行なうことができる。

EDG受容体を含有する細胞としては、EDG受容体を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500rpm~3000rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000rpm~30000rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したEDG受容体と細胞由来のリン脂質や膜タンパク質などの膜成分が多く含まれる。

EDG受容体を含有する細胞や膜画分中のEDG受容体の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0042】

リガンドとEDG受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする上記の (i) ~ (iii) を実施するためには、例えば、適当なEDG受容体画分と、標識したリガンドが必要である。

EDG受容体画分としては、天然型のEDG受容体画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型EDG受容体画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたりガンドなどが用いられる。

具体的には、リガンドと EDG 受容体との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず EDG 受容体を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより EDG 受容体標品を調製する。バッファーには、pH 4～10（望ましくは pH 6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドと EDG 受容体との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる EDG 受容体やリガンドの分解を抑える目的で PMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～10ml の EDG 受容体溶液に、一定量（5000cpm～500000cpm）の標識したリガンドを添加し、同時に 10^{-4}M ～ 10^{-10}M の試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約 0℃～50℃、望ましくは約 4℃～37℃で、約 20分～24時間、望ましくは約 30分～3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたは γ -カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ B_0 ）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ $B_0 - \text{NSB}$ ）を 100%とした時、特異的結合量（ $B - \text{NSB}$ ）が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0043】

リガンドと EDG 受容体との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする上記の (iv)～(v) の方法を実施するためには、例えば、レセプタータンパク質を介する細胞刺激活性を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、EDG受容体を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸、cAMPなど）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

また、試験化合物としては、EDG受容体の活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置に基づいて、リガンド結合ポケットに結合するように設計された化合物が好ましく用いられる。EDG受容体の活性部位の原子座標およびリガンド結合ポケットの位置の測定は、公知の方法あるいはそれに準じる方法を用いて行うことができる。

【0044】

EDG受容体に対するアゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法は以下の(1)または(2)に従えばよい。

(1) 前記(i)～(iii)のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、リガンドとEDG受容体との結合性を変化させる（特に、結合を阻害する）化合物を得た後、該化合物が上記した細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩はEDG受容体に対するアゴニストであり、該活性を有しない化合物またはその塩はEDG受容体に対するアンタゴニストである。

(2) (a)試験化合物をEDG受容体を含有する細胞に接触させ、上記した細胞

刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩はEDG受容体に対するアゴニストである。

(b) EDG受容体を活性化する化合物（例えば、リガンド）をEDG受容体を含有する細胞に接触させた場合と、EDG受容体を活性化する化合物および試験化合物をEDG受容体を含有する細胞に接触させた場合における、EDG受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較する。EDG受容体を活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させ得る化合物またはその塩はEDG受容体に対するアンタゴニストである。

【0045】

リガンドとEDG受容体との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、EDG受容体、EDG受容体を含有する細胞またはson膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

(1) 測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

(2) EDG受容体標品

EDG受容体を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

(3) 標識リガンド

市販の[³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識したリガンド水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μ Mに希釈する。

(4) リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン（シグマ社製）を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

【0046】

2. 測定法

(1) 12穴組織培養用プレートにて培養したEDG受容体発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

(2) 10^{-3} ～ 10^{-10} Mの試験化合物溶液を5 μ l加えた後、標識リガンドを5 μ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに 10^{-3} Mのリガンドを5 μ l加えておく。

(3) 反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

(4) 液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式で求める。

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀ : 最大結合量

【0047】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドとEDG受容体との結合性を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(1) レセプターを介して細胞刺激活性を有する化合物（いわゆる、EDG受容体に対するアゴニスト）、(2) 該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、EDG受容体に対するアンタゴニスト）、(3) リガンドとEDG受容体との結合力を増強する化合物、あるいは(4) リガンドとEDG受容体との結合力を減少させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

EDG受容体に対するアゴニストは、EDG受容体に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該生理活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

EDG受容体に対するアンタゴニストは、EDG受容体に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該生理活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドとEDG受容体との結合力を増強する化合物は、EDG受容体に対するリガンドが有する生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドとEDG受容体との結合力を減少させる化合物は、EDG受容体に対するリガンドが有する生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

【0048】

(7) EDG受容体とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）を含有する各種疾病の予防・治療剤

リガンドとEDG受容体との結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）やリガンドは、EDG受容体の機能不全に関連する疾患、例えば、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫に対する予防・治療剤として用いることができる。

該化合物やリガンドをEDG受容体の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤として使用する場合は、上述したような常套手段に従って製剤化することができる。

【0049】

(8) 本発明の抗体を用いるタンパク質などの定量、本発明の抗体を含有する診断剤およびそれを用いる診断方法

本発明の抗体は、EDG受容体を特異的に認識することができるので、被検液中のEDG受容体の定量、特にサンドイッチ免疫測定法、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどによる定量などに使用することができる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特

別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えてEDG受容体、IL20またはそれらの塩の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「メソッズ・イン・エンジモロジー」(Methods in ENZYMOLOGY) Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、EDG受容体を感度良く定量することができる。

さらに、本発明の抗体を用いて、生体内でのEDG受容体を定量することによって、EDG受容体の機能不全に関連する各種疾患の診断をすることができる。

例えば、本発明の抗体を用いてEDG受容体の濃度を定量することによって、EDG受容体の濃度の増加または減少が検出された場合、例えば、EDG受容体の機能不全または過剰発現に起因する疾患、特に糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫に罹患している可能性が高い、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在するEDG受容体を特異的に検出するために使用することができる。また、EDG受容体を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中のEDG受容体の検出、被検細胞内におけるEDG受容体の挙動の分析などのために使用することができる。

【0050】

(9) 細胞膜におけるEDG受容体の量を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明の抗体は、EDG受容体の特異的に認識することができるので、細胞膜におけるEDG受容体の量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち本発明は、例えば、

(i) 非ヒト哺乳動物の(a)血液、(b)特定の臓器、(c)臓器から単離した組織もしくは細胞等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれるEDG受容体またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜におけるEDG受容体の量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(ii) EDG受容体を発現する形質転換体を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれるEDG受容体を定量することによる、細胞膜におけるEDG受容体の量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(iii) 非ヒト哺乳動物の(a)血液、(b)特定の臓器、(c)臓器から単離した組織もしくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層でのEDG受容体の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上のEDG受容体を確認することによる、細胞膜におけるEDG受容体の量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

(iv) EDG受容体を発現する形質転換体を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層でのEDG受容体の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上のEDG受容体を確認することによる、細胞膜におけるEDG受容体の量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

【0051】

細胞膜画分に含まれるEDG受容体の定量は具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には担癌マウス

など) に対して、薬剤 (例えば、抗癌剤など) あるいは物理的ストレス (例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など) などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器 (例えば、脳、肺、大腸、前立腺など)、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、例えば、適当な緩衝液 (例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ヘプス緩衝液など) 等に懸濁し、臓器、組織あるいは細胞を破壊し、界面活性剤 (例えば、トリトン X 100TM、ツイーン 20TMなど) などを用い、さらに遠心分離や濾過、カラム分画などの手法を用いて細胞膜画分を得る。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm ~ 3000 rpm) で短時間 (通常、約1分 ~ 10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm ~ 30000 rpm) で通常30分 ~ 2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したEDG受容体と細胞由来のリン脂質や膜タンパク質などの膜成分が多く含まれる。

細胞膜画分に含まれるEDG受容体は、例えば、本発明の抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウエスタンブロット解析などにより定量することができる。

かかるサンドイッチ免疫測定法は上記の方法と同様に行なうことができ、ウエスタンブロットは公知の手段により行なうことができる。

(ii) EDG受容体を発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、細胞膜画分に含まれるEDG受容体を定量することができる。

【0052】

細胞膜におけるEDG受容体の量を変化させる化合物のスクリーニングは、

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前 (30分前 ~ 24時間前、好ましくは30分前

～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前)もしくは一定時間後(30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後)、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後(30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後)、細胞膜におけるEDG受容体の量を定量することにより行なうことができ、

(ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後(1日後～7日後、好ましくは1日後～3日後、より好ましくは2日後～3日後)、細胞膜におけるEDG受容体の量を定量することにより行なうことができる。

細胞膜画分に含まれるEDG受容体またはその部分ペプチドの確認は具体的には以下のようにして行なう。

(iii) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど)に対して、薬剤(例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など)あるいは物理的ストレス(例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など)などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器(例えば、脳、肺、大腸など)、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、常法に従い組織切片とし、本発明の抗体を用いて免疫染色を行う。細胞表層での該レセプタータンパク質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することにより、定量的または定性的に、細胞膜におけるEDG受容体の量を確認することができる。

(iv) EDG受容体を発現する形質転換体等を用いて同様の手段をとることにより確認することもできる。

【0053】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、細胞膜におけるEDG受容体の量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ)細胞膜におけるEDG受容体の量を増加させることにより、レセプター

を介する細胞刺激活性を増強させる化合物、(ロ)細胞膜におけるEDG受容体の量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、EDG受容体の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、EDG受容体の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

【0054】

(10) 細胞膜におけるEDG受容体の量を変化させる化合物、及びその化合物を含有する各種疾病の予防・治療剤

EDG受容体は上記のとおり、例えば、生体内で重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、細胞膜におけるEDG受容体の量を変化させる化合物は、EDG受容体の機能不全に関連する疾患の予防・治療剤として用いることができる。

例えば、細胞膜におけるEDG受容体の量を変化させる化合物は、EDG受容体の機能不全または過剰発現などに起因する疾患（例えば、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫）の予防・治療薬として用いることができる。

該化合物をEDG受容体の機能不全または過剰発現に関連する疾患の予防・治療剤として使用する場合は、上述した常套手段に従って製剤化することができる。

【0055】

(11) 本発明の抗体を含有する医薬

EDG受容体に対する中和抗体は、EDG受容体の関与する活性、例えばシグナル伝達機能を不活性化する活性を有している。従って、本発明の抗体が中和活性を有する場合は、EDG受容体の関与するシグナル伝達、例えば、EDG受容体を介する細胞刺激活性を不活性化することができる。したがって、このような

抗体は、EDG受容体の過剰発現などに起因する疾患の予防・治療に用いることができる。

例えば、EDG受容体に対する中和抗体は、EDG受容体の過剰発現などに起因する疾患（例えば、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫）の予防・治療薬として用いることができる。

本発明の予防・治療剤の製剤化は、前述のEDG受容体を含有する製剤と同様に製剤化することができる。

【0056】

（12）本発明のDNA導入動物の作製

本発明は、外来性の本発明のDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- 〔1〕本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- 〔2〕非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第〔1〕記載の動物、
- 〔3〕ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第〔2〕記載の動物、および
- 〔4〕本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA導入動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAEーデキストラン法などにより目的とするDNAを導入することによって作出することができる。また、該DNA導入方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを導入し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA導入動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

【0057】

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常なEDG受容体を発現させるDNAを意味し、例えば、正常なEDG受容体の機能を抑制するレセプタータンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に導入させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを導入させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA導入哺乳動物を作出することができる。

【0058】

EDG受容体の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 λ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、(a) ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、(b) 各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1, K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ペプチド鎖延長因子1 α （EF-1 α ）、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子1 α （EF-1 α ）のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA導入哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネターなどが用いられる。

【0059】

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常なEDG受容体の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なEDG受容体の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は導入動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを導入させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環

境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

【0060】

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的にEDG受容体の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA導入動物を用いて、EDG受容体の機能亢進症や、EDG受容体に関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを導入させた哺乳動物は、遊離したEDG受容体の増加症状を有することから、EDG受容体に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽

細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

【0061】

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的にEDG受容体の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA導入動物を用いて、EDG受容体の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、EDG受容体の機能不活性型不応症における本発明の異常レセプタータンパク質による正常レセプタータンパク質の機能阻害 (dominant negative作用) を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを導入させた哺乳動物は、遊離したEDG受容体の増加症状を有することから、EDG受容体の機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA導入動物のその他の利用可能性として、例えば、

- (a) 組織培養のための細胞源としての使用、
- (b) 本発明のDNA導入動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたEDG受容体を分析することによる、EDG受容体により特異的に発現あるいは活性化するEDG受容体との関連性についての解析、
- (c) DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
- (d) 上記(c)記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤

のスクリーニング、および

(e) 本発明の変異レセプタータンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA導入動物を用いて、EDG受容体の機能不活性型不応症などを含む、EDG受容体に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、EDG受容体に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA導入動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA導入細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、EDG受容体産生細胞またはIL20産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることもことができ、EDG受容体およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA導入動物を用いて、EDG受容体の機能不活性型不応症を含む、EDG受容体に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA導入動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、EDG受容体に関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

【0062】

(13) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

〔1〕 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、

〔2〕 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第〔1〕項記載の胚幹細胞、

- 〔3〕ネオマイシン耐性である第〔1〕項記載の胚幹細胞、
〔4〕非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第〔1〕項記載の胚幹細胞、
〔5〕ゲッ歯動物がマウスである第〔4〕項記載の胚幹細胞、
〔6〕本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
〔7〕該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第〔6〕項記載の非ヒト哺乳動物、
〔8〕非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第〔6〕項記載の非ヒト哺乳動物、
〔9〕ゲッ歯動物がマウスである第〔8〕項記載の非ヒト哺乳動物、および
〔10〕第〔7〕項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしているEDG受容体の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的にEDG受容体の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

【0063】

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離

し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいは *lacZ* (β -ガラクトシダーゼ遺伝子)、*cat* (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子) を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させる DNA 配列 (例えば、polyA 付加シグナルなど) を挿入し、完全なメッセンジャー RNA を合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築した DNA 配列を有する DNA 鎖 (以下、ターゲッティングベクターと略記する) を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られた ES 細胞について本発明の DNA 上あるいはその近傍の DNA 配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上の DNA 配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明の DNA 以外の近傍領域の DNA 配列をプライマーとした PCR 法により解析し、本発明のノックアウト ES 細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明の DNA を不活化させる元の ES 細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 Evans と Kaufman の方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスの ES 細胞の場合、現在、一般的には 129 系の ES 細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかな ES 細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6 マウスや C57BL/6 の採卵数の少なさを DBA/2 との交雑により改善した BDF₁ マウス (C57BL/6 と DBA/2 との F₁) を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF₁ マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6 マウスを背景に持つので、これを用いて得られた ES 細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6 マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景を C57BL/6 マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES 細胞を樹立する場合、一般には受精後 3.5 日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に 8 細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率

よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

【0064】

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約 10^6 個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数（約50個）で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1～10000U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001～0.5%トリプシン/0.1～5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1～3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細

胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschmanら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年〕、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおけるEDG受容体またはEDG受容体の細胞生物学的検討において有用である。

【0065】

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変

異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、EDG受容体のヘテロ発現不全個体であり、EDG受容体のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔からEDG受容体のホモ発現不全個体を得ることができる。

【0066】

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、EDG受容体により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、EDG受容体の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検

討に有用である。

【0067】

(14a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

【0068】

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の疾患症状が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上改善した場合、該試験化合物を糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫に対して治療・予防効果を有する化合物

として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、EDG受容体の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患（例えば、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫）に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記したEDG受容体とリガンドとの結合性を変化させる化合物を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に例えば、糖尿病性腎症患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、糖尿病性腎症患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を

静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg 当りに換算した量を投与することができる。

【0069】

(14b) 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、EDG受容体をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) で置換している場合、本来、EDG受容体の発現する組織で、EDG受容体の代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド (X-gal) のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便にEDG受容体の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、EDG受容体欠損マウスまたはその組織切片をグル

タルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-gal を含む染色液で、室温または 37℃ 付近で、約 30 分ないし 1 時間反応させた後、組織標本を 1 mM EDTA/PBS 溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZ をコードする mRNA を検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明の DNA に対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸、有機酸など) や塩基 (例、アルカリ金属など) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など) との塩などが用いられる。

【0070】

本発明の DNA に対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、EDG 受容体の発現を促進し、EDG 受容体の機能を促進することができるので、例えば、EDG 受容体の機能不全に関連する疾患などの予防・治療薬などの医薬として有用である。

本発明の DNA に対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、EDG 受容体の発現を阻害し、該レセプタータンパク質の機能を阻害することができるので、例えば、EDG 受容体の発現過多に関連する疾患などの予防・治療薬などの医薬として有用である。

具体的には、EDG 受容体をコードする DNA に対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物は、例えば、糖尿病性腎症、慢性腎不全、腎炎、糸球体腎炎、間質性腎疾患または腎性浮腫などの予防・治療薬として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に

用いることができる。

【0071】

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記したEDG受容体またはその塩とリガンドとの結合性を变化させる化合物を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に例えば、糖尿病性腎症患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、糖尿病性腎症患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、EDG受容体のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのレセプタータンパク質を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、EDG受容体そのものの体内での産生能力

を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

【0072】

(略号の表示)

本明細書において、塩基、アミノ酸、化合物等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づき表示を行い、その例を以下に記載する。またアミノ酸が光学異性体を取りうる場合、特に明示しなければL体を表す。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
a または A	: アデニン
t または T	: チミン
g または G	: グアニン
c または C	: シトシン
u または U	: ウラシル
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン

C y s	: システイン
M e t	: メチオニン
G l u	: グルタミン酸
A s p	: アスパラギン酸
L y s	: リジン
A r g	: アルギニン
H i s	: ヒスチジン
P h e	: フェニルアラニン
T y r	: チロシン
T r p	: トリプトファン
P r o	: プロリン
A s n	: アスパラギン
G l n	: グルタミン
p G l u	: ピログルタミン酸

【0073】

本明細書の配列表記載の配列は以下のとおりである。

〔配列番号：1〕

ヒトEDG-2受容体のアミノ酸配列を表す。

〔配列番号：2〕

ヒトEDG-2受容体のアミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を表す。

〔配列番号：3〕

ラットEDG-2受容体のアミノ酸配列を表す。

〔配列番号：4〕

ラットEDG-2受容体のアミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を表す。

〔配列番号: 5〕

ヒト EDG-3 受容体のアミノ酸配列を表す。

〔配列番号: 6〕

ヒト EDG-3 受容体のアミノ酸配列をコードする cDNA の塩基配列を表す。

〔配列番号: 7〕

ラット EDG-3 受容体の部分アミノ酸配列を表す。

〔配列番号: 8〕

ラット EDG-3 受容体の部分アミノ酸配列をコードする cDNA の塩基配列を表す。

〔配列番号: 9〕

ヒト EDG-5 受容体のアミノ酸配列を表す。

〔配列番号: 10〕

ヒト EDG-5 受容体のアミノ酸配列をコードする cDNA の塩基配列を表す。

〔配列番号: 11〕

ラット EDG-5 受容体のアミノ酸配列を表す。

〔配列番号: 12〕

ラット EDG-5 受容体のアミノ酸配列をコードする cDNA の塩基配列を表す。

〔配列番号: 13〕

実施例 1 で用いた EDG-1 受容体用プライマーの塩基配列を表す。

〔配列番号: 14〕

実施例 1 で用いた EDG-1 受容体用プライマーの塩基配列を表す。

〔配列番号: 15〕

実施例 1 で用いた EDG-1 受容体用プローブの塩基配列を表す。

〔配列番号: 16〕

実施例 1 で用いた EDG-2 受容体用プライマーの塩基配列を表す。

〔配列番号: 17〕

実施例 1 で用いた EDG-2 受容体用プライマーの塩基配列を表す。

[配列番号: 18]

実施例 1 で用いた EDG-2 受容体用プローブの塩基配列を表す。

[配列番号: 19]

実施例 1 で用いた EDG-3 受容体用プライマーの塩基配列を表す。

[配列番号: 20]

実施例 1 で用いた EDG-3 受容体用プライマーの塩基配列を表す。

[配列番号: 21]

実施例 1 で用いた EDG-3 受容体用プローブの塩基配列を表す。

[配列番号: 22]

実施例 1 で用いた EDG-4 受容体用プライマーの塩基配列を表す。

[配列番号: 23]

実施例 1 で用いた EDG-4 受容体用プライマーの塩基配列を表す。

[配列番号: 24]

実施例 1 で用いた EDG-4 受容体用プローブの塩基配列を表す。

[配列番号: 25]

実施例 1 で用いた EDG-5 受容体用プライマーの塩基配列を表す。

[配列番号: 26]

実施例 1 で用いた EDG-5 受容体用プライマーの塩基配列を表す。

[配列番号: 27]

実施例 1 で用いた EDG-5 受容体用プローブの塩基配列を表す。

[配列番号: 28]

実施例 1 で用いた EDG-6 受容体用プライマーの塩基配列を表す。

[配列番号: 29]

実施例 1 で用いた EDG-6 受容体用プライマーの塩基配列を表す。

[配列番号: 30]

実施例 1 で用いた EDG-6 受容体用プローブの塩基配列を表す。

[配列番号: 31]

実施例 1 で用いた EDG-7 受容体用プライマーの塩基配列を表す。

〔配列番号：32〕

実施例1で用いたEDG-7受容体用プライマーの塩基配列を表す。

〔配列番号：33〕

実施例1で用いたEDG-7受容体用プローブの塩基配列を表す。

〔配列番号：34〕

実施例1で用いたEDG-8受容体用プライマーの塩基配列を表す。

〔配列番号：35〕

実施例1で用いたEDG-8受容体用プライマーの塩基配列を表す。

〔配列番号：36〕

実施例1で用いたEDG-8受容体用プローブの塩基配列を表す。

〔配列番号：37〕

実施例2で用いたEDG-2受容体用プライマーの塩基配列を表す。

〔配列番号：38〕

実施例2で用いたEDG-2受容体用プライマーの塩基配列を表す。

〔配列番号：39〕

実施例2で用いたEDG-2受容体用プローブの塩基配列を表す。

〔配列番号：40〕

実施例2で用いたEDG-3受容体用プライマーの塩基配列を表す。

〔配列番号：41〕

実施例2で用いたEDG-3受容体用プライマーの塩基配列を表す。

〔配列番号：42〕

実施例2で用いたEDG-3受容体用プローブの塩基配列を表す。

〔配列番号：43〕

実施例2で用いたEDG-5受容体用プライマーの塩基配列を表す。

〔配列番号：44〕

実施例2で用いたEDG-5受容体用プライマーの塩基配列を表す。

〔配列番号：45〕

実施例2で用いたEDG-5受容体用プローブの塩基配列を表す。

【0074】

【実施例】

以下に実施例を示して本発明をより詳細に説明するが、これは本発明の範囲を限定するものではない。

【0075】

参考例1 遺伝子発現解析方法

以下の実施例においては、ヒト成人正常脳由来のmRNA試料を用い、TaqMan法によって、この試料中の標的Gタンパク質共役型レセプター、チロシンリン酸化酵素型レセプター、イオンチャネルなどのファミリーに属する遺伝子由来mRNAの有無及びその産生量を定量し、標的Gタンパク質共役型レセプター、チロシンリン酸化酵素型レセプター、イオンチャネルなどのファミリーに属する遺伝子の発現レベルを解析する。本例においては、384穴プレートを用いて、標的Gタンパク質共役型レセプター(354種)、チロシンリン酸化酵素型レセプター、イオンチャネルなどのファミリーに属する遺伝子の発現を解析する。標的GPCR遺伝子として、例えばORL; M₁; M₂; M₃; M₄; M₅; A₁; A_{2A}; A_{2B}; A₃; α 1A; α 1B; α 1D; α 2A; α 2B; α 2C; β 1; β 2; β 3; AT1; AT2; BB1; BB2; bb3; B₁; B₂; CB1; CB2; CCR1; CCR2; CCR3; CCR4; CCR5; CCR6; CCR7; CCR8; CCR9; CCR10; CXCR1; CXCR2; CXCR3; CXCR4; CXCR5; CX₃CR1; XCR1; C3a; C5a; fMLP; CCK₁; CCK₂; CRF₁; CRF₂; D1; D2; D3; D4; D5; ETA; ETB; GAL1; GAL2; GAL3; mglu₁; mglu₂; mglu₃; mglu₄; mglu₅; mglu₆; mglu₇; mglu₈; FSH; LSH; TSH; H₁; H₂; H₃; H₄; 5-HT_{1A}; 5-HT_{1B}; 5-HT_{1D}; 5-HT_{1B}; 5-HT_{1F}; 5-HT_{2A}; 5-HT_{2F}; 5-HT_{2C}; 5-HT₃; 5-HT₄; 5-HT_{5A}; 5-HT_{5B}; 5-HT₆; 5-HT₇; BLT; CysLT₁; CysLT₂; edg₁; edg₂; edg₃; edg₄; MC₁; MC₂; MC₃

; MC₄; MC₅; MT₁; MT₂; MT₃; Y₁; Y₂; Y₄; Y₅; Y₆; NTS₁; NTS₂; DOP; KOP; MOP; NOP; P₂Y₁; P₂Y₂; P₂Y₄; P₂Y₆; P₂Y₁₁; P₂Y₁₂; PPAR- α ; PPAR- β ; PPAR- γ ; DP; FP; IP; TP; EP₁; EP₂; EP₃; EP₄; PAR₁; PAR₂; PAR₃; PAR₄; sst₁; sst₂; sst₃; sst₄; sst₅; NK₁; NK₂; NK₃; TRH₁; TRH₂; VPAC₁; VPAC₂; PAC₁; V_{1a}; V_{1b}; V₂; OT; Na⁺チャネル (タイプI; タイプII/タイプIIA; タイプIII; SCL11/NaG; PN1; NaCh6; NaDRG; SkM1/ μ 1, SkM2); K⁺チャネル (Kv; EAG; KQT; IRK; ROMK; GIRK; K_{ATP}等); Ca²⁺チャネル (α 1G; α 1E; α 1S; α 1C; α 1D; α 1B; α 1A; IP₃; リアノジンレセプターなど); Cl⁻チャネル (GABA_A; GABA_C; グリシンレセプター; ClC0; ClC1; CFTRなど); 非選択性カチオンチャネル (nAChR; 5-HT₃; NMDA; AMPA; P₂XATP; CNGなど) などから選択される。

【0076】

実施例1 ヒト正常メサングウム細胞におけるGタンパク質共役型レセプターEDGファミリーのmRNAの発現

正常ヒトメサングウム細胞 (旭テクノグラス社より購入) から、Isogen (ニッポンジーン社) のマニュアルにしたがってtotal RNAを調製した。このRNA 1 μ gから逆転写酵素としてSuperScript II逆転写酵素 (GIBCO BRL社) を用い、添付のマニュアルに従って42℃で反応を行い、反応終了後にエタノール沈殿してTEに溶解した (RNA 100 ng/ μ l相当)。EDGファミリーのmRNA発現量はSequence Detection System Prism 7900HTシステム (アプライドバイオシステムズ社) を用いて定量した。それぞれのレセプター発現量定量のために、それぞれのレセプターを特異的認識するTaqManプローブおよびプライ

マーを Primer Express (PE Applied Biosystems 社製ソフトウェア) を用いて設計し合成した。

EDG-1 受容体の検出用には、

5'-CCACCGACCCATGTACTATTTT-3' (配列番号: 13), 5'-TGTAGGCTACTCCTGCCAACAG-3' (配列番号: 14) および TaqMan probe として 5'-(Fam)-TTGGCAATCTGGCCTCTCAGA-(Tamra)-3' (配列番号: 15) を使用した。

EDG-2 受容体検出用には 5'-ACTGTCAGCACATGGCTCCTT-3' (配列番号: 16), 5'-ACCGTAATGTGCCTCTCGATT-3' (配列番号: 17) および TaqMan probe として 5'-(Fam)-ATTGACACCAGCCTGACGGCAT-(Tamra)-3' (配列番号: 18) を使用した。

EDG-3 受容体検出用には 5'-CCGTGCTCTTCTTGGTCAT-3' (配列番号: 19), 5'-CCAGATGGCAATCAAAACC-3' (配列番号: 20) および TaqMan probe として 5'-(Fam)-TGCAGCTTCATCGTCTTGGAGAACCT-(Tamra)-3' (配列番号: 21) を使用した。

EDG-4 受容体検出用には 5'-CCTGGTCAAGACTGTTGTCATC-3' (配列番号: 22), 5'-CAGGACATTGCAGGACTCA-3' (配列番号: 23) および TaqMan probe として 5'-(Fam)-TGGTACTGCTCCTGGATGGTTTAGGCT-(Tamra)-3' (配列番号: 24) を使用した。

EDG-5 受容体検出用には 5'-CCAACAAGGTCCAGGAACA-3' (配列番号: 25), 5'-AGGTTTTCCACCACAATGG-3' (配列番号: 26) および TaqMan probe として 5'-(Fam)-AATTATACCAAGGAGACGCTGGAAACGC-(Tamra)-3' (配列番号: 27) を使用した。

EDG-6 受容体検出用には 5'-GAACTGCCTGTGCGCCTTT-3' (配列番号: 28), 5'-CCATAGAGGCCCATGATGGT-3' (配列番号: 29) および TaqMan probe として 5'-(Fam)-TCTGCCCCTCTACTCCAAGCGCTACATC-(Tamra)-3' (配列番号: 30) を使用した。

EDG-7 受容体検出用には 5'-TGA CTGCTTCCCTCACCAA-3' (配列番号: 31), 5'-GCATCCTCATGATTGACATGTG-3' (配列番号: 32) および TaqMan probe として 5'-(Fam)-TTGCTGGTTATCGCCGTGGAGA-(Tamra)-3' (配列番号: 33) を使用

した。

EDG-8受容体検出用には5'-CTTGCTCCACTGTCTTGCC-3' (配列番号: 34) , 5'-TAGAGTGCACAGATCGCGG-3' (配列番号: 35) およびTaqMan probeとして5'-(Fam)-CTCTACGCCAAGGCCTACGTGCTCTTCT-(Tamra)-3' (配列番号: 36) を使用した。

定量のための反応液はTaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社) のマニュアルに従い、それぞれのGタンパク質共役型レセプターのプライマー (0.9 μ M) 、プローブ (0.25 μ M) 、cDNAをtotal RNA 25 ng相当加えて調製した。PCR反応は50℃・2分、95℃・10分の後、95℃・15秒、60℃・1分のサイクルを40回繰り返した。その結果、ヒト正常メサングウム細胞ではEDG-1受容体が34、420コピー/25 ng total RNA、EDG-2受容体が624、726コピー/25 ng total RNA、EDG-3受容体が176、531コピー/25 ng total RNA、EDG-4受容体が396コピー/25 ng total RNA、EDG-5受容体が16、468コピー/25 ng total RNA、EDG-6受容体が28コピー/25 ng total RNA、EDG-7受容体が722コピー/25 ng total RNA、EDG-8受容体が4、480コピー/25 ng total RNAであった。このことはEDG受容体ファミリー、特にEDG-1受容体、EDG-2受容体、EDG-3受容体、EDG-5受容体がメサングウム細胞の増殖、糖の取り込み、アポトーシス、遊走などの調節を介して糖尿病性腎症などの腎臓疾患に関与していることを示すものであった。

【0077】

【実施例2】糖尿病性腎症モデルラットの腎臓におけるEDG受容体mRNA発現量解析

42週齢、68週齢のWistar FattyおよびWistar Leanラットより腎臓を摘出し、total RNAをIsogen (ニッポンジェン社) を用いてマニュアルにしたがって調製した。total RNA 1 μ gからランダムプライマーを用いて逆転写反応した。逆転写酵素SuperScr

ipt II (GIBCO BRL社) を使用し、添付のプロトコールにしたがって反応させ、エタノール沈殿して40 μ l のTEに溶解した。mRNAの発現量の定量にはABI PRISM 7900HT (アプライドバイオシステムズ社) を使用した。増幅と検出のためのプライマーとTaqMan probeをPrimer Expressの配列を (アプライドバイオシステムズ社) を利用してデザインした。

その配列を以下に示す。

[EDG-2 受容体用]

5' -TGTCCTAGACCCAAGAGACTTTAG-3' (配列番号: 37)、

5' -GGTCCCTTCTCTTTTCCAAA-3' (配列番号: 38)、

5' -(Fam)-ATGAAGTTGCTTGGTAGCCCCCATCTTC-(Tamra)-3' (配列番号: 39)。

[EDG-3 受容体用]

5' -ATCTTGACGCGCATCTA-3' (配列番号: 40)、

5' -TGGATCTCTCGGAGTTGTGGTT-3' (配列番号: 41)、

5' -(Fam)-TGGTCAAGTCCAGCAGCCGCAG-(Tamra)-3' (配列番号: 42)。

[EDG-5 受容体用]

5' -GTTTGCCCGAGAGGGTTCA-3' (配列番号: 43)、

5' -CTTGTCTCTCGATGGCAATGG-3' (配列番号: 44)、

5' -(Fam)-CTTCATCACGCTCTCTGCCTCGGTCTT-(Tamra)-3' (配列番号: 45)。

定量のための反応液はTaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社) のプロトコールにしたがって、プライマー (0.9 μ M)、プローブ (0.25 μ M)、サンプルcDNAを1 μ l を反応液に加えて1 wellあたり20 μ l として調製した。ABI PRISM 7900HTでの反応は、50 $^{\circ}$ C (2分)、95 $^{\circ}$ C (10分) 後、95 $^{\circ}$ C (15秒)、60 $^{\circ}$ C (1分) のサイクルを40回行なった。

GAPDHのmRNAの定量は、TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents (VIC probe) (アプライドバイオシステムズ社) を用いて、プロトコールにしたがって測定した。

得られた各GPCRのmRNA発現量をGAPDHの発現量で補正した。その

結果、糖尿病性腎症モデル W i s t a r F a t t y ラットの腎臓において、E D G - 2 受容体、E D G - 3 受容体および E D G - 5 受容体の発現量が高いことが明らかになった。

【 0 0 7 8 】

【配列表】

[Sequence Listing]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Use of EDG Receptor

<130> B02398

<160> 45

<210> 1

<211> 364

<212> PRT

<213> human

<400> 1

Met	Ala	Ala	Ile	Ser	Thr	Ser	Ile	Pro	Val	Ile	Ser	Gln	Pro	Gln	Phe			
				5					10					15				
Thr	Ala	Met	Asn	Glu	Pro	Gln	Cys	Phe	Tyr	Asn	Glu	Ser	Ile	Ala	Phe			
			20					25						30				
Phe	Tyr	Asn	Arg	Ser	Gly	Lys	His	Leu	Ala	Thr	Glu	Trp	Asn	Thr	Val			
			35				40						45					
Ser	Lys	Leu	Val	Met	Gly	Leu	Gly	Ile	Thr	Val	Cys	Ile	Phe	Ile	Met			
			50				55					60						
Leu	Ala	Asn	Leu	Leu	Val	Met	Val	Ala	Ile	Tyr	Val	Asn	Arg	Arg	Phe			
		65				70				75				80				
His	Phe	Pro	Ile	Tyr	Tyr	Leu	Met	Ala	Asn	Leu	Ala	Ala	Ala	Asp	Phe			
			85						90					95				
Phe	Ala	Gly	Leu	Ala	Tyr	Phe	Tyr	Leu	Met	Phe	Asn	Thr	Gly	Pro	Asn			
			100						105					110				

Thr Arg Arg Leu Thr Val Ser Thr Trp Leu Leu Arg Gln Gly Leu Ile
 115 120 125
 Asp Thr Ser Leu Thr Ala Ser Val Ala Asn Leu Leu Ala Ile Ala Ile
 130 135 140
 Glu Arg His Ile Thr Val Phe Arg Met Gln Leu His Thr Arg Met Ser
 145 150 155 160
 Asn Arg Arg Val Val Val Val Ile Val Val Ile Trp Thr Met Ala Ile
 165 170 175
 Val Met Gly Ala Ile Pro Ser Val Gly Trp Asn Cys Ile Cys Asp Ile
 180 185 190
 Glu Asn Cys Ser Asn Met Ala Pro Leu Tyr Ser Asp Ser Tyr Leu Val
 195 200 205
 Phe Trp Ala Ile Phe Asn Leu Val Thr Phe Val Val Met Val Val Leu
 210 215 220
 Tyr Ala His Ile Phe Gly Tyr Val Arg Gln Arg Thr Met Arg Met Ser
 225 230 235 240
 Arg His Ser Ser Gly Pro Arg Arg Asn Arg Asp Thr Met Met Ser Leu
 245 250 255
 Leu Lys Thr Val Val Ile Val Leu Gly Ala Phe Ile Ile Cys Trp Thr
 260 265 270
 Pro Gly Leu Val Leu Leu Leu Leu Asp Val Cys Cys Pro Gln Cys Asp
 275 280 285
 Val Leu Ala Tyr Glu Lys Phe Phe Leu Leu Leu Ala Glu Phe Asn Ser
 290 295 300
 Ala Met Asn Pro Ile Ile Tyr Ser Tyr Arg Asp Lys Glu Met Ser Ala
 305 310 315 320
 Thr Phe Arg Gln Ile Leu Cys Cys Gln Arg Ser Glu Asn Pro Thr Gly
 325 330 335
 Pro Thr Glu Gly Ser Asp Arg Ser Ala Ser Ser Leu Asn His Thr Ile

340 345 350
 Leu Ala Gly Val His Ser Asn Asp His Ser Val Val
 355 360
 <210> 2
 <211> 1092
 <212> DNA
 <213> human
 <400> 2
 atggctgcca tctctacttc catccctgta atttcacagc cccagttcac agccatgaat 60
 gaaccacagt gcttctacaa cgagtccatt gccttctttt ataaccgaag tggaaagcat 120
 cttgccacag aatggaacac agtcagcaag ctgggtgatgg gacttggaaat cactgtttgt 180
 atcttcatca tgttggccaa cctattggtc atgggtggcaa tctatgtcaa ccgccgcttc 240
 cattttccta tttattacct aatggctaata ctggctgctg cagacttctt tgctgggttg 300
 gcctacttct atctcatgtt caacacagga cccaatactc ggagactgac tgtagcaca 360
 tggctcctgc gtcagggcct cattgacacc agcctgacgg catctgtggc caacttactg 420
 gctattgcaa tcgagaggca cattacggtt ttccgcatgc agctccacac acgcatgagc 480
 aaccggcggg tagtgggtgt cattgtggtc atctggacta tggccatcgt tatgggtgct 540
 ataccagtg tgggctggaa ctgtatctgt gatattgaaa attgttccaa catggcaccc 600
 ctctacagtg actcttactt agtcttctgg gccattttca acttgggtgac ctttgtggta 660
 atgggtggttc tctatgctca catctttggc tatgttcgcc agaggactat gagaatgtct 720
 cggcatagtt ctggaccccg gcggaatcgg gataccatga tgagtcttct gaagactgtg 780
 gtcattgtgc ttggggcctt tatcatctgc tggactcctg gattgggtttt gttacttcta 840
 gacgtgtgct gtccacagtg cgacgtgctg gcctatgaga aattcttcct tctccttgct 900
 gaattcaact ctgcatgaa ccccatcatt tactcctacc gcgacaaaga aatgagcgcc 960
 accttaggc agatcctctg ctgccagcgc agtgagaacc ccaccggccc cacagaaggc 1020
 tcagaccgct cggttcctc cctcaaccac accatcttgg ctggagtica cagcaatgac 1080
 cactctgtgg tt 1092
 <210> 3
 <211> 364

<212> PRT

<213> Rat

<400> 3

Met Ala Ala Ala Ser Thr Ser Ser Pro Val Ile Ser Gln Pro Gln Phe
5 10 15
Thr Ala Met Asn Glu Gln Gln Cys Phe Tyr Asn Glu Ser Ile Ala Phe
20 25 30
Phe Tyr Asn Arg Ser Gly Lys Tyr Leu Ala Thr Glu Trp Asn Thr Val
35 40 45
Ser Lys Leu Val Met Gly Leu Gly Ile Thr Val Cys Val Phe Ile Met
50 55 60
Leu Ala Asn Leu Leu Val Met Val Ala Ile Tyr Val Asn Arg Arg Phe
65 70 75 80
His Phe Pro Ile Tyr Tyr Leu Met Ala Asn Leu Ala Ala Ala Asp Phe
85 90 95
Phe Ala Gly Leu Ala Tyr Phe Tyr Leu Met Phe Asn Thr Gly Pro Asn
100 105 110
Thr Arg Arg Leu Thr Val Ser Thr Trp Leu Leu Arg Gln Gly Leu Ile
115 120 125
Asp Thr Ser Leu Thr Ala Ser Val Ala Asn Leu Leu Ala Ile Ala Ile
130 135 140
Glu Arg His Ile Thr Val Phe Arg Met Gln Leu His Thr Arg Met Ser
145 150 155 160
Asn Arg Arg Val Val Val Val Ile Val Val Ile Trp Thr Met Ala Ile
165 170 175
Val Met Gly Ala Ile Pro Ser Val Gly Trp Asn Cys Ile Cys Asp Ile
180 185 190
Asp His Cys Ser Asn Met Ala Pro Leu Tyr Ser Asp Ser Tyr Leu Val
195 200 205

Phe Trp Ala Ile Phe Asn Leu Val Thr Phe Val Val Met Val Val Leu
 210 215 220

Tyr Ala His Ile Phe Gly Tyr Val Arg Gln Arg Thr Met Arg Met Ser
 225 230 235 240

Arg His Ser Ser Gly Pro Arg Arg Asn Arg Asp Thr Met Met Ser Leu
 245 250 255

Leu Lys Thr Val Val Ile Val Leu Gly Ala Phe Ile Val Cys Trp Thr
 260 265 270

Pro Gly Leu Val Leu Leu Leu Leu Asp Val Cys Cys Pro Gln Cys Asp
 275 280 285

Val Leu Ala Tyr Glu Lys Phe Phe Leu Leu Leu Ala Glu Phe Asn Ser
 290 295 300

Ala Met Asn Pro Ile Ile Tyr Ser Tyr Arg Asp Lys Glu Met Ser Ala
 305 310 315 320

Thr Phe Arg Gln Ile Leu Cys Cys Gln Arg Asn Glu Asn Pro Asn Gly
 325 330 335

Pro Thr Glu Gly Ser Asp Arg Ser Ala Ser Ser Leu Asn His Thr Ile
 340 345 350

Leu Ala Gly Val His Ser Asn Asp His Ser Val Val
 355 360

<210> 4

<211> 1092

<212> DNA

<213> Rat

<400> 4

atggcagctg cctctacttc cagccctgtg atttcacagc cccagttcac agccatgaac 60
 gaacaacagt gcttctacaa cgagtctatc gccttcttct ataaccggag tggaaagtat 120
 ctagccacag aatggaacac tgtgagcaag ctggtgatgg gactgggcat cactgtctgc 180
 gtgttcatca tgctggccaa tctactggtc atggtggcaa tttacgtcaa ccgccgcttc 240

catttccta tttattactt gatggccaac ctggctgctg cagacttctt cgctggactg 300
gcctacttct acctgatgtt caacacggga cctaataccc ggagactgac cgtgagcaca 360
tggcttctcc ggcagggcct catcgacacc agcctgacgg cttctgtggc caacctgctg 420
gccattgcca tcgagaggca catcacagtt ttccgaatgc agctccatac acgaatgagc 480
aaccgacgtg tgggtggtgt gattgtagtc atctggacta tggccattgt gatgggtgcc 540
ataccagtg tgggctggaa ctgcatctgt gatatcgatc attgttccaa catggcgccc 600
ctctacagtg actcctactt agtccttctgg gccattttca acctggtgac ctttgtggtc 660
atgggtggtt tctacgctca catctttggc tatgttcgcc agaggactat gagaatgtcc 720
cggcatagtt ctggaccag gaggaatcgg gacacatga tgagccttct gaagactgtg 780
gtcattgtgc tgggtgcctt tattgtctgc tggactccgg gattggtctt gctactgctc 840
gatgtgtgtt gcccgcagtg cgatgtcctg gcctatgaga agttcttcct cctcctggcc 900
gagttcaact ctgctatgaa ccccatcatc tactcctacc gcgacaaaga gatgagcgcc 960
accttcaggc agatcctgtg ttgccagcgc aacgagaacc ccaacggccc cacggaaggc 1020
tctgaccgct cggcctcctc cctcaaccac actattctgg ctggagtcca cagcaatgac 1080
cactctgtgg tt 1092

<210> 5

<211> 378

<212> PRT

<213> human

<400> 5

Met Ala Thr Ala Leu Pro Pro Arg Leu Gln Pro Val Arg Gly Asn Glu

5

10

15

Thr Leu Arg Glu His Tyr Gln Tyr Val Gly Lys Leu Ala Gly Arg Leu

20

25

30

Lys Glu Ala Ser Glu Gly Ser Thr Leu Thr Thr Val Leu Phe Leu Val

35

40

45

Ile Cys Ser Phe Ile Val Leu Glu Asn Leu Met Val Leu Ile Ala Ile

50

55

60

Trp Lys Asn Asn Lys Phe His Asn Arg Met Tyr Phe Phe Ile Gly Asn

65	70	75	80
Leu Ala Leu Cys Asp	Leu Leu Ala Gly	Ile Ala Tyr Lys	Val Asn Ile
85	90	95	
Leu Met Ser Gly Lys	Lys Thr Phe Ser	Leu Ser Pro Thr	Val Trp Phe
100	105	110	
Leu Arg Glu Gly Ser	Met Phe Val Ala	Leu Gly Ala Ser	Thr Cys Ser
115	120	125	
Leu Leu Ala Ile Ala	Ile Glu Arg His	Leu Thr Met Ile	Lys Met Arg
130	135	140	
Pro Tyr Asp Ala Asn	Lys Arg His Arg	Val Phe Leu Leu	Ile Gly Met
145	150	155	160
Cys Trp Leu Ile Ala	Phe Thr Leu Gly	Ala Leu Pro Ile	Leu Gly Trp
165	170	175	
Asn Cys Leu His Asn	Leu Pro Asp Cys	Ser Thr Ile Leu	Pro Leu Tyr
180	185	190	
Ser Lys Lys Tyr Ile	Ala Phe Cys Ile	Ser Ile Phe Thr	Ala Ile Leu
195	200	205	
Val Thr Ile Val Ile	Leu Tyr Ala Arg	Ile Tyr Phe Leu	Val Lys Ser
210	215	220	
Ser Ser Arg Lys Val	Ala Asn His Asn	Asn Ser Glu Arg	Ser Met Ala
225	230	235	240
Leu Leu Arg Thr Val	Val Ile Val Val	Ser Val Phe Ile	Ala Cys Trp
245	250	255	
Ser Pro Leu Phe Ile	Leu Phe Leu Ile	Asp Val Ala Cys	Arg Val Gln
260	265	270	
Ala Cys Pro Ile Leu	Phe Lys Ala Gln	Trp Phe Ile Val	Leu Ala Val
275	280	285	
Leu Asn Ser Ala Met	Asn Pro Val Ile	Tyr Thr Leu Ala	Ser Lys Glu
290	295	300	

Met Arg Arg Ala Phe Phe Arg Leu Val Cys Asn Cys Leu Val Arg Gly
 305 310 315 320
 Arg Gly Ala Arg Ala Ser Pro Ile Gln Pro Ala Leu Asp Pro Ser Arg
 325 330 335
 Ser Lys Ser Ser Ser Ser Asn Asn Ser Ser His Ser Pro Lys Val Lys
 340 345 350
 Glu Asp Leu Pro His Thr Asp Pro Ser Ser Cys Ile Met Asp Lys Asn
 355 360 365
 Ala Ala Leu Gln Asn Gly Ile Phe Cys Asn
 370 375

<210> 6

<211> 1134

<212> DNA

<213> human

<400> 6

```

atggcaactg ccctcccgcc gcgtctccag ccggtgcggg ggaacgagac cctgcgggag   60
cattaccagt acgtggggaa gttggcgggc aggctgaagg aggcctccga gggcagcacg   120
ctcaccaccg tgctcttctt ggtcatctgc agcttcatcg tcttggagaa cctgatggtt   180
ttgattgcca tctggaaaaa caataaat t cacaaccgca tgtacttttt cattggcaac   240
ctggctctct gcgacctgct ggccggcatc gcttacaagg tcaacattct gatgtctggc   300
aagaagacgt tcagcctgtc tcccacggtc tggttcctca gggagggcag tatgttcgtg   360
gcccttgggg cgtccacctg cagcttactg gccatcgcca tcgagcggca cttgacaatg   420
atcaaatga  ggccttacga cgccaacaag aggcaccgcg tcttctcct gatcgggatg   480
tgctggctca ttgccttcac gctgggcgcc ctgccattc tgggctggaa ctgcctgcac   540
aatctccctg actgctctac catcctgccc ctctactcca agaagtacat tgccttctgc   600
atcagcatct tcacggccat cctggtgacc atcgtgatcc tctacgcacg catctacttc   660
ctggtgaagt ccagcagccg taaggtggcc aaccacaaca actcggagcg gtccatggca   720
ctgctgcgga ccgtggtgat tgtggtgagc gtgttcatcg cctgctggtc cccactcttc   780
atcctcttcc tcattgatgt ggcctgcagg gtgcaggcgt gcccatacct cttcaaggct   840

```

cagtgggttca tcgtgttggc tgtgctcaac tccgccatga acccggtcat ctacacgctg 900
gccagcaagg agatgcggcg ggccttcttc cgtctggtct gcaactgcct ggtcagggga 960
cggggggccc gcgcctcacc catccagcct gcgctcgacc caagcagaag taaatcaagc 1020
agcagcaaca atagcagcca ctctccgaag gtcaaggaag acctgccccca cacagacccc 1080
tcctctgca tcatggacaa gaacgcagca cttcagaatg ggatcttctg caac 1134

<210> 7

<211> 222

<212> PRT

<213> Rat

<400> 7

Arg Met Tyr Phe Phe Ile Gly Asn Leu Ala Leu Cys Asp Leu Leu Ala
5 10 15
Gly Ile Ala Tyr Lys Val Asn Ile Leu Met Ser Gly Arg Lys Thr Phe
20 25 30
Ser Leu Ser Pro Thr Val Trp Phe Leu Arg Glu Gly Ser Met Phe Val
35 40 45
Ala Leu Gly Ala Ser Thr Cys Ser Leu Leu Ala Ile Ala Ile Glu Arg
50 55 60
His Leu Thr Met Ile Lys Met Arg Pro Tyr Asp Ala Asn Lys Lys His
65 70 75 80
Arg Val Phe Leu Leu Ile Gly Met Cys Trp Leu Ile Ala Phe Ser Leu
85 90 95
Gly Ala Leu Pro Ile Leu Gly Trp Asn Cys Leu Glu Asn Phe Pro Asp
100 105 110
Cys Ser Thr Ile Leu Pro Leu Tyr Ser Lys Lys Tyr Ile Ala Phe Leu
115 120 125
Ile Ser Ile Phe Thr Ala Ile Leu Val Thr Ile Val Ile Leu Tyr Ala
130 135 140
Arg Ile Tyr Phe Leu Val Lys Ser Ser Ser Arg Arg Val Ala Asn His

145 150 155 160
 Asn Ser Glu Arg Ser Met Ala Leu Leu Arg Thr Val Val Ile Val Val
 165 170 175
 Ser Val Phe Ile Ala Cys Trp Ser Pro Leu Phe Ile Leu Phe Leu Ile
 180 185 190
 Asp Val Ala Cys Arg Ala Lys Glu Cys Ser Ile Leu Phe Lys Ser Gln
 195 200 205
 Trp Phe Ile Met Leu Ala Val Leu Asn Ser Ala Met Asn Pro
 210 215 220

<210> 8

<211> 666

<212> DNA

<213> Rat

<400> 8

cgcatgtact ttttcattgg caacttggct ctctgcgacc tgctggccgg catagcctac 60
 aaggtcaaca ttctgatgtc cggtaggaag acgttcagcc tgtctccaac agtgtggttc 120
 ctcagggagg gcagtatgtt cgtagccctg ggcgcatcca catgcagctt attggccatt 180
 gccattgagc ggcacctgac catgatcaag atgaggccgt acgacgcaa caagaagcac 240
 cgcgtgttcc ttctgattgg gatgtgctgg ctaattgcct tctcgctggg tgccctgccc 300
 atcctgggct ggaactgcct ggagaacttt cccgactgct ctaccatctt gcccctctac 360
 tccaagaaat acattgcctt tctcatcagc atcttcacag ccattctggt gaccatcgtc 420
 atcttgtacg cgcgcatcta cttcctggtc aagtccagca gccgcagggt ggccaaccac 480
 aactccgaga gatccatggc ccttctgcgg accgtagtga tcgtggtgag cgtgttcac 540
 gcctgttggt cccccctttt catcctcttc ctcacgatg tggcctgcag ggcgaaggag 600
 tgctccatcc tcttcaagag tcagtgggtc atcatgctgg ctgtcctcaa ctccgcatg 660
 aaccca 666

<210> 9

<211> 353

<212> PRT

<213> human

<400> 9

Met Gly Ser Leu Tyr Ser Glu Tyr Leu Asn Pro Asn Lys Val Gln Glu
 5 10 15
 His Tyr Asn Tyr Thr Lys Glu Thr Leu Glu Thr Gln Glu Thr Thr Ser
 20 25 30
 Arg Gln Val Ala Ser Ala Phe Ile Val Ile Leu Cys Cys Ala Ile Val
 35 40 45
 Val Glu Asn Leu Leu Val Leu Ile Ala Val Ala Arg Asn Ser Lys Phe
 50 55 60
 His Ser Ala Met Tyr Leu Phe Leu Gly Asn Leu Ala Ala Ser Asp Leu
 65 70 75 80
 Leu Ala Gly Val Ala Phe Val Ala Asn Thr Leu Leu Ser Gly Ser Val
 85 90 95
 Thr Leu Arg Leu Thr Pro Val Gln Trp Phe Ala Arg Glu Gly Ser Ala
 100 105 110
 Ser Ile Thr Leu Ser Ala Ser Val Phe Ser Leu Leu Ala Ile Ala Ile
 115 120 125
 Glu Arg His Val Ala Ile Ala Lys Val Lys Leu Tyr Gly Ser Asp Lys
 130 135 140
 Ser Cys Arg Met Leu Leu Leu Ile Gly Ala Ser Trp Leu Ile Ser Leu
 145 150 155 160
 Val Leu Gly Gly Leu Pro Ile Leu Gly Trp Asn Cys Leu Gly His Leu
 165 170 175
 Glu Ala Cys Ser Thr Val Leu Pro Leu Tyr Ala Lys His Tyr Val Leu
 180 185 190
 Cys Val Val Thr Ile Phe Ser Ile Ile Leu Leu Ala Ile Val Ala Leu
 195 200 205
 Tyr Val Arg Ile Tyr Cys Val Val Arg Ser Ser His Ala Asp Met Ala

210 215 220
 Ala Pro Gln Thr Leu Ala Leu Leu Lys Thr Val Thr Ile Val Leu Gly
 225 230 235 240
 Val Phe Ile Val Cys Trp Leu Pro Ala Phe Ser Ile Leu Leu Leu Asp
 245 250 255
 Tyr Ala Cys Pro Val His Ser Cys Pro Ile Leu Tyr Lys Ala His Tyr
 260 265 270
 Phe Phe Ala Val Ser Thr Leu Asn Ser Leu Leu Asn Pro Val Ile Tyr
 275 280 285
 Thr Trp Arg Ser Arg Asp Leu Arg Arg Glu Val Leu Arg Pro Leu Gln
 290 295 300
 Cys Trp Arg Pro Gly Val Gly Val Gln Gly Arg Arg Arg Val Gly Thr
 305 310 315 320
 Pro Gly His His Leu Leu Pro Leu Arg Ser Ser Ser Ser Leu Glu Arg
 325 330 335
 Gly Met His Met Pro Thr Ser Pro Thr Phe Leu Glu Gly Asn Thr Val
 340 345 350

Val

<210> 10

<211> 1059

<212> DNA

<213> human

<400> 10

atgggcagct tgtactcgga gtacctgaac cccaacaagg tccaggaaca ctataattat 60
 accaaggaga cgctggaaac gcaggagacg acctcccgcc aggtggcctc ggccttcac 120
 gtcacacctt gttgcgcat tgtggtggaa aaccttctgg tgctcattgc ggtggcccga 180
 aacagcaagt tccactcggc aatgtacctg tttctgggca acctggccgc ctccgatcta 240
 ctggcaggcg tggccttcgt agccaatacc ttgctctctg gctctgtcac gctgaggctg 300
 acgcctgtgc agtgggtttgc ccgggagggc tctgcctcca tcacgtcttc ggctctgtc 360

```

ttcagcctcc tggccatcgc cattgagcgc cacgtggcca ttgccaaggt caagctgtat 420
ggcagcgaca agagctgccg catgcttctg ctcatcgggg cctcgtggct catctcgtg 480
gtcctcggtg gcctgcccac ccttggtctg aactgcctgg gccacctcga ggctgtctcc 540
actgtcctgc ctctctacgc caagcattat gtgctgtgcg tggtagcat cttctccatc 600
atcctgttgg ccatcgtggc cctgtacgtg cgcactact gcgtgggtccg ctcaagccac 660
gctgacatgg ccgccccgca gacgctagcc ctgctcaaga cggtcaccat cgtgctaggc 720
gtctttatcg tctgctggct gccgccttc agcatcctcc ttctggacta tgcctgtccc 780
gtccactcct gcccgatcct ctacaaagcc cactactttt tcgccgtctc caccctgaat 840
tccctgctca accccgtcat ctacacgtgg cgcagccggg acctgcggcg ggaggtgctt 900
cggccgctgc agtgctggcg gccgggggtg ggggtgcaag gacggaggcg ggtcgggacc 960
ccgggccacc acctcctgcc actccgcagc tccagctccc tggagagggg catgcacatg 1020
cccacgtcac ccacgtttct ggagggaac acggtggtc 1059

```

<210> 11

<211> 352

<212> PRT

<213> Rat

<400> 11

```

Met Gly Gly Leu Tyr Ser Glu Tyr Leu Asn Pro Glu Lys Val Gln Glu
      5              10              15
His Tyr Asn Tyr Thr Lys Glu Thr Leu Asp Met Gln Glu Thr Pro Ser
      20              25              30
Arg Lys Val Ala Ser Ala Phe Ile Ile Ile Leu Cys Cys Ala Ile Val
      35              40              45
Val Glu Asn Leu Leu Val Leu Ile Ala Val Ala Arg Asn Ser Lys Phe
      50              55              60
His Ser Ala Met Tyr Leu Phe Leu Gly Asn Leu Ala Ala Ser Asp Leu
      65              70              75              80
Leu Ala Gly Val Ala Phe Val Ala Asn Thr Leu Leu Ser Gly Pro Val
      85              90              95

```

Thr Leu Ser Leu Thr Pro Leu Gln Trp Phe Ala Arg Glu Gly Ser Ala
 100 105 110
 Phe Ile Thr Leu Ser Ala Ser Val Phe Ser Leu Leu Ala Ile Ala Ile
 115 120 125
 Glu Arg Gln Val Ala Ile Ala Lys Val Lys Leu Tyr Gly Ser Asp Lys
 130 135 140
 Ser Cys Arg Met Leu Met Leu Ile Gly Ala Ser Trp Leu Ile Ser Leu
 145 150 155 160
 Ile Leu Gly Gly Leu Pro Ile Leu Gly Trp Asn Cys Leu Asp His Leu
 165 170 175
 Glu Ala Cys Ser Thr Val Leu Pro Leu Tyr Ala Lys His Tyr Val Leu
 180 185 190
 Cys Val Val Thr Ile Phe Ser Val Ile Leu Leu Ala Ile Val Ala Leu
 195 200 205
 Tyr Val Arg Ile Tyr Phe Val Val Arg Ser Ser His Ala Asp Val Ala
 210 215 220
 Gly Pro Gln Thr Leu Ala Leu Leu Lys Thr Val Thr Ile Val Leu Gly
 225 230 235 240
 Val Phe Ile Ile Cys Trp Leu Pro Ala Phe Ser Ile Leu Leu Leu Asp
 245 250 255
 Ser Thr Cys Pro Val Arg Ala Cys Pro Val Leu Tyr Lys Ala His Tyr
 260 265 270
 Phe Phe Ala Phe Ala Thr Leu Asn Ser Leu Leu Asn Pro Val Ile Tyr
 275 280 285
 Thr Trp Arg Ser Arg Asp Leu Arg Arg Glu Val Leu Arg Pro Leu Leu
 290 295 300
 Cys Trp Arg Gln Gly Lys Gly Ala Thr Gly Arg Arg Gly Gly Asn Pro
 305 310 315 320
 Gly His Arg Leu Leu Pro Leu Arg Ser Ser Ser Ser Leu Glu Arg Gly

	325	330	335	
Leu His Met Pro Thr Ser Pro Thr Phe Leu Glu Gly Asn Thr Val Val				
	340	345	350	
<210> 12				
<211> 1056				
<212> DNA				
<213> Rat				
<400> 12				
atgggcggtt tatactcaga gtacctcaat cctgagaagg ttcaggaaca ctacaattac				60
accaaggaga cgctggacat gcaggagacg ccctcccga aggtggcctc cgccttcac				120
atcattttat gctgtgccat cgtgggtggag aaccttctgg tgctaatacgc agtggccagg				180
aacagcaagt tccactcagc catgtacctg ttcctcggca acctggcagc ctccgacctg				240
ctggcaggcg tggccttcgt ggccaacacc ttgctctccg gacctgtcac cctgtcctta				300
actcccttgc agtggtttgc ccgagagggt tcagccttca tcacgctctc tgcctcggtc				360
ttcagcctcc tggccattgc catcgagaga caagtggcca tcgccaagggt caagctctac				420
ggcagtgaca aaagctgtcg aatgttgatg ctcatggggg cctcttggct gatatcgctg				480
attctgggtg gcttgcccat cctgggctgg aattgtctgg accatctgga ggcttgctcc				540
actgtgctgc ccctctatgc taagcactat gtgctctgcg tggtcacat cttctctgtc				600
atcttactgg ctatcgtagc cttgtacgtc cgaatctact tcgtagtccg ctcaagccat				660
gcggacgttg ctggtcctca gacgttggcc ctgctcaaga cagtcacat cgtactgggt				720
gttttcatca tctgtggct gccggctttt agcatccttc tcttagactc tacctgtccc				780
gtccgggcct gtctgtcct ctacaaagcc cattatttct ttgccttcgc caccctcaac				840
tctctgctca accctgtcat ctatacatgg cgtagccggg accttcggag ggaggtactg				900
aggcccctgc tgtgtggcg gcagggggaag ggagcaacag ggcgagagg tgggaaccct				960
ggtcaccgac tcctgcccct ccgcagctcc agctccctgg agagaggctt gcatatgcct				1020
acatcgccaa catttctgga gggcaacaca gtggtc				1056
<210> 13				
<211> 22				
<212> DNA				

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 13

ccaccgaccc atgtactatt tt

22

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 14

tgtaggctac tcctgccaac ag

22

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe, labeled 5'-terminal with FAM and 3'-terminal with TAMRA

<400> 15

ttggcaatct ggccctctca ga

22

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 16

actgtcagca catggctcct t

21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 17

accgtaatgt gcctctcgat t 21

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe, labeled 5'-terminal with FAM and 3'-terminal with TAMRA

<400> 18

attgacacca gcctgacggc at 22

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 19

ccgtgctctt cttgggtcat 19

<210> 20

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 20

ccagatggca atcaaaacc

19

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe, labeled 5'-terminal with FAM and 3'-terminal with TAMRA

<400> 21

tgcagcttca tcgtcttgga gaacct

26

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 22

cctgggtcaag actgttgtca tc

22

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 23

caggacattg caggactca

19

<210> 24

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe, labeled 5'-terminal with FAM and 3'-terminal with TAMRA

<400> 24

tggtactgct.cctggatggt ttaggct 27

<210> 25

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 25

ccaacaaggt ccaggaaca 19

<210> 26

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 26

aggttttcca ccacaatgg 19

<210> 27

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe, labeled 5'-terminal with FAM and 3'-terminal with TAMRA

<400> 27

aattatacca aggagacgct ggaaacgc 28

<210> 28

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 28

gaactgcctg tgcgccttt 19

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 29

ccatagaggc ccatgatggt 20

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe, labeled 5'-terminal with FAM and 3'-terminal with TAMRA

<400> 30

tctgccctc tactccaagc gctacatc 28

<210> 31

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 31

tgactgcttc cctcaccaa

19

<210> 32

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 32

gcacacctcat gattgacatg tg

22

<210> 33

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe, labeled 5'-terminal with FAM and 3'-terminal with TAMRA

<400> 33

ttgctgggta tcgccgtgga ga

22

<210> 34

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 34

cttgctccac tgtcttgcc

19

<210> 35

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 35

tagagtgcac agatcgcg

19

<210> 36

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe, labeled 5'-terminal with FAM and 3'-terminal with TAMRA

<400> 36

ctctacgcca aggcctacgt gctcttct

28

<210> 37

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 37

tgtccctaga cccaagagac tttag

25

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 38

ggtcccccttc tcttttccaa a

21

<210> 39

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe, labeled 5'-terminal with FAM and 3'-terminal with TAMRA

<400> 39

atgaacttgc ttggtagccc ccatcttc

28

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 40

atcttgtacg cgcgcatcta

20

<210> 41

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 41

tggatctctc ggagttgtgg tt

22

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe, labeled 5'-terminal with FAM and 3'-terminal with TAMRA

<400> 42

tggtcaagtc cagcagccgc ag

22

<210> 43

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 43

gtttgcccga gagggttca

19

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 44

cttgtctctc gatggcaatg g

21

<210> 45

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe, labeled 5'-terminal with FAM and 3'-terminal with TAMRA

<400> 45

cttcatcacg ctctctgcct cggctctt

27

【図面の簡単な説明】

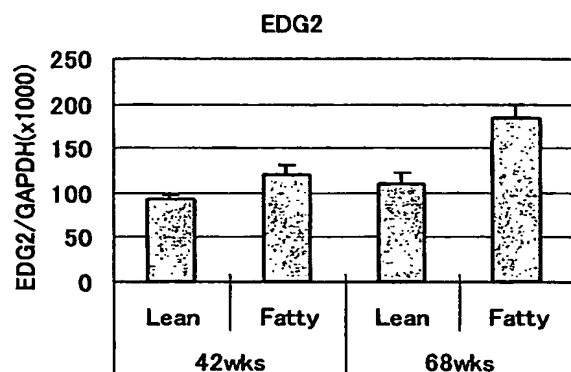
【図1】 糖尿病性腎症モデルラット (Wister) の腎臓における EDG-2 受容体 mRNA の発現を示す。横軸の Lean は Wister Lean を、Fatty は Wister Fatty を、42 wks は 42 週齢を、68 wks は 68 週齢を示す。縦軸は GAPDH mRNA 発現量に対する EDG-2 受容体 mRNA 発現量の相対値を示す。

【図2】 糖尿病性腎症モデルラット (Wister) の腎臓における EDG-3 受容体 mRNA の発現を示す。横軸の Lean は Wister Lean を、Fatty は Wister Fatty を、42 wks は 42 週齢を、68 wks は 68 週齢を示す。縦軸は GAPDH mRNA 発現量に対する EDG-3 受容体 mRNA 発現量の相対値を示す。

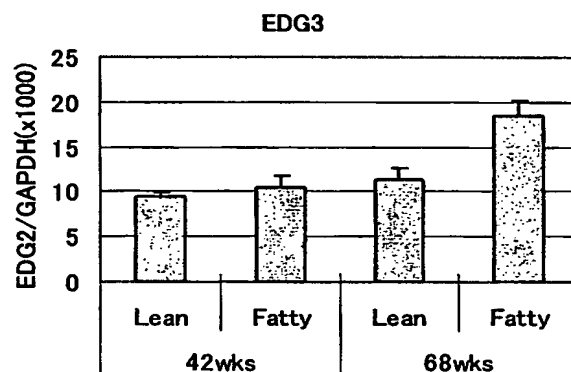
【図3】 糖尿病性腎症モデルラット (Wister) の腎臓における EDG-5 受容体 mRNA の発現を示す。横軸の Lean は Wister Lean を、Fatty は Wister Fatty を、42 wks は 42 週齢を、68 wks は 68 週齢を示す。縦軸は GAPDH mRNA 発現量に対する EDG-5 受容体 mRNA 発現量の相対値を示す。

【書類名】 図面

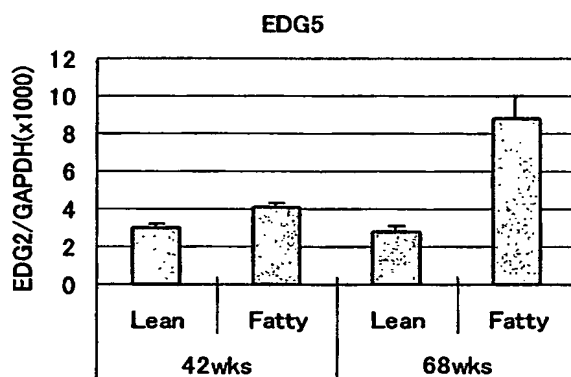
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 糖尿病性腎症等の予防・治療薬のスクリーニング等の提供。

【解決手段】 配列番号：1、配列番号：5または配列番号：9で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質（EDG-2受容体、EDG-3受容体またはEDG-5受容体）またはその塩を用いることを特徴とする糖尿病性腎症等の予防・治療薬のスクリーニング方法などを提供する。

【選択図】 なし

特願 2002-361415

ページ : 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[000002934]

1. 変更年月日

1992年 1月22日

[変更理由]

住所変更

住所

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

氏名

武田薬品工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKewed/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.